



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 59 314 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/16

⑳ Aktenzeichen: 198 59 314.7
㉔ Anmeldetag: 22. 12. 1998
㉕ Offenlegungstag: 29. 6. 2000

DE 198 59 314 A 1

㉑ Anmelder:
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

㉒ Erfinder:
Wolleschensky, Ralf, Dipl.-Phys., 99510 Apolda, DE

㉓ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 195 10 102 C1
US 54 22 712

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉔ Anordnung zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem Mikroskop

㉕ Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionlicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird und mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugen beeinflusst, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflusst durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.

DE 198 59 314 A 1

Beschreibung

In Fig. 1-3 werden beispielhaft erfindungsgemäße Anordnungen erläutert. In Fig. 1 wird über einen Spiegel SP und einen Strahlteiler ST das Licht (Anregungslicht) zweier Laser L1, L2 mit unterschiedlichen Wellenlängen in einen gemeinsamen Strahlengang eingekoppelt, der an der Seite S1 eines verspiegelten Prismas in Richtung eines AOTF (Acousto-Optical Tunable Filter) reflektiert wird. Das Anregungslicht wird in den AOTF eingeführt, wobei in der ersten Ordnung gebeugtes Licht für über die Ansteuerfrequenz des AOTF eingestellte Wellenlänge genau in Richtung eines Pinholes PH mit vor- und nachgeordneter Pinholeoptik PHO zur Einstellung des Strahlprofils abgelenkt wird, während andere mögliche Wellenlängen ungebeugt in nullter Ordnung den AOTF durchqueren und nicht auf das Pinhole gelangen.

Das Pinhole PH dient hier gleichzeitig als Anregungs- und Detektionspinhole. Über Scaneinheiten SC1, SC2 und eine Scanoptik SCO wird das Anregungslicht in Richtung eines Mikroskopischen Strahlengangs MI in Richtung einer Probe abgebildet.

Das von der Probe emittierte Licht, bestehend aus Anteilen des Anregungslichtes und wellenlängenverschobenen Fluoreszenzanteilen, durchläuft den Lichtweg in umgekehrter Richtung bis zum AOTF. Hier gelangen die Wellenlängenanteile des Anregungslichtes wiederum über die Beugung erster Ordnung auf die Spiegelseite S1 des Prismas PS, während die Fluoreszenzanteile den AOTF ungebeugt in nullter Ordnung durchqueren und dadurch einen Winkel zum reflektierten Anregungslicht einnehmen.

Zwischen den rückkehrenden Strahlen nullter und erster Ordnung ist nun genau die Spitze zwischen den Prismenflächen S1 und S2 angeordnet, wodurch das Fluoreszenzlicht auf die Seite S2 trifft und von dieser in Richtung einer Detektionseinheit, hier beispielhaft bestehend aus einem Linienfilter LF, einem Farbteiler NFT und zwei Detektoren für unterschiedliche Wellenlängen, reflektiert wird.

Durch die niedrige Bandbreite des AOTF von ca. 2 nm Bandbreite für das Anregungslicht wirkt er als extremer Kantenfilter mit deutlichen Vorteilen etwa gegen dichroitische Filter mit Bandbreiten größer 10 nm.

Das ist von besonderer Bedeutung, weil der Abstand von Anregungswellenlänge und Fluoreszenzwellenlängen kleiner als 10 nm sein kann und durch die erfindungsgemäße Anordnung eine wellenlängenabhängige Trennung dennoch möglich ist.

Durch Frequenzänderung kann der AOTF von der Wellenlänge des Lasers L1 auf die Wellenlänge des Lasers L2 umgeschaltet werden und wiederum das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt werden.

Statt des Prismas mit den Seiten S1, S2 können auch zwei unabhängige, den Seiten S1, S2 entsprechende, aber nicht zusammenhängende Spiegel verwendet werden. Ein Vorteil ist, daß diese auch drehbar ausgebildet sein können, um eine genaue Einstellung auf den AOTF bzw. die Detektion DE zu ermöglichen.

In Fig. 2 ist eine ähnliche Anordnung mit nur einem Scanner SC dargestellt. Hier ist statt des Prismas ein Spiegel S vorgesehen, der das Anregungslicht in Richtung des AOTF analog zu Fig. 1 umlenkt, wobei hier das in nullter Ordnung zurückkehrende Fluoreszenzlicht durch den AOTF hindurchgehende Licht neben dem Spiegel S verläuft und auf diese Weise in Richtung einer hier nicht dargestellten Detektion gelangt.

Grundsätzlich sind auch Anordnungen denkbar, bei der der AOTF allein als Separationseinheit von Anregungslicht und Fluoreszenzlicht dienen kann, indem das Laserlicht in

Richtung der ersten Ordnung ohne ein vorgeschaltetes Element in den AOTF gelangt und das Detektionslicht unter einem Winkel zum Anregungslicht den AOTF verläßt und direkt in eine Detektionseinheit gelangt, was lediglich Auswirkungen auf die Baulänge hat, da der Winkel mit beispielsweise vier Grad recht klein ausfällt und Überlagerungen der Wellenlängenanteile vermieden werden sollen.

Weiterhin kann auch nur für das Fluoreszenzlicht ein separierender Spiegel vorgesehen sein.

In Fig. 3 ist eine weitere vorteilhafte Ausführung in Form eines unverspiegelten Prismas vorgesehen, das durch Brechung das Licht eines Anregungslasers in erster Ordnung in den AOTF hineinführt und die nullte Ordnung (das Fluoreszenzlicht) in Richtung der Detektion DE ablenkt.

Durch den Winkel zwischen erster und nullter Ordnung und unterschiedlicher Wellenlängen ist vorteilhaft eine deutliche Separierung der Wellenlängenanteile möglich.

Die Erfindung ist besonders vorteilhaft in einem Laser-Scanning-Mikroskop mit einem AOTF anwendbar.

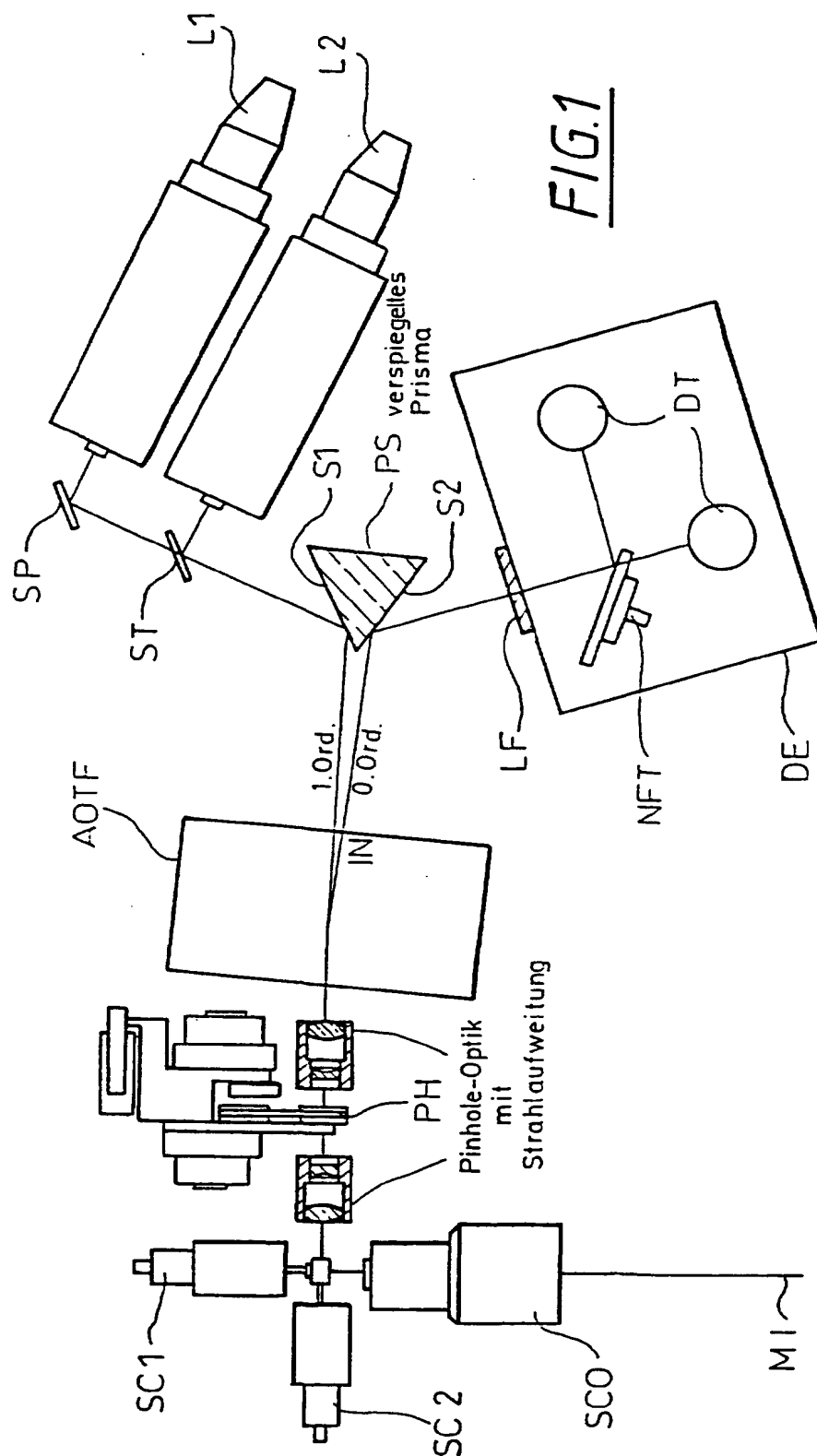
Andere vorteilhafte Anwendungen eines anderen lichtbeugenden Elementes zur Strahlungstrennung durch verschiedene Beugungsordnungen sind jedoch in einem mikroskopischen Strahlengang denkbar und vorteilhaft in den Umfang der Erfindung eingeschlossen.

Patentansprüche

1. Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser-Scanning-Mikroskop.
2. Anordnung nach Anspruch 1, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird.
3. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das lichtbeugende Element mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugung beeinflusst, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflusst durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.
4. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei im Anregungsstrahlengang vor dem Element und/oder im Detektionsstrahlengang nach dem Element zur verbesserten Trennung der Lichtanteile mindestens ein die Lichtrichtung beeinflussendes optisches Element vorgesehen ist.
5. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem AOTF als lichtbeugendes Element.
6. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem Reflexionselement als optisches Element.
7. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem lichtbrechenden Element als optisches Element.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



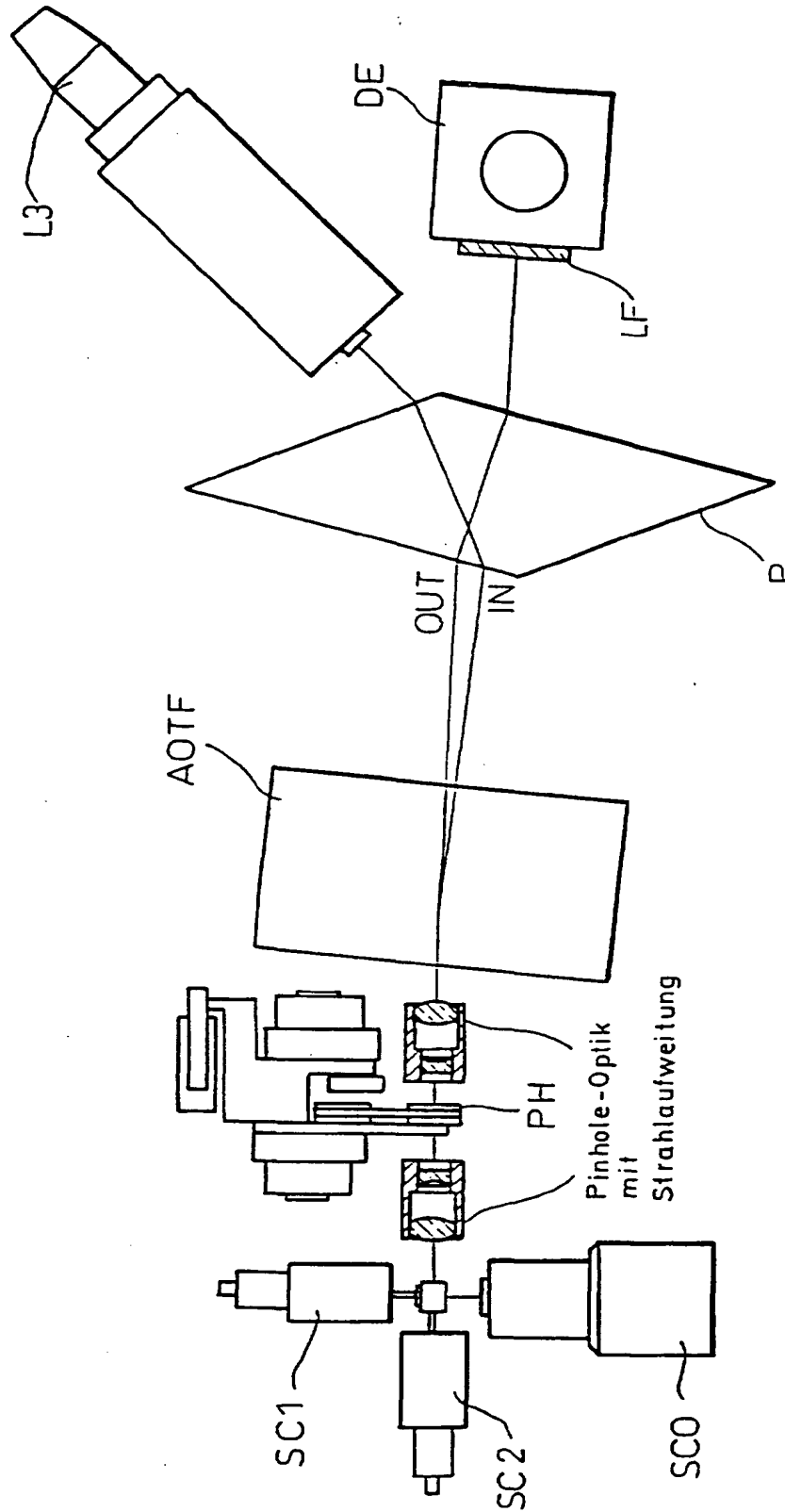


FIG. 3

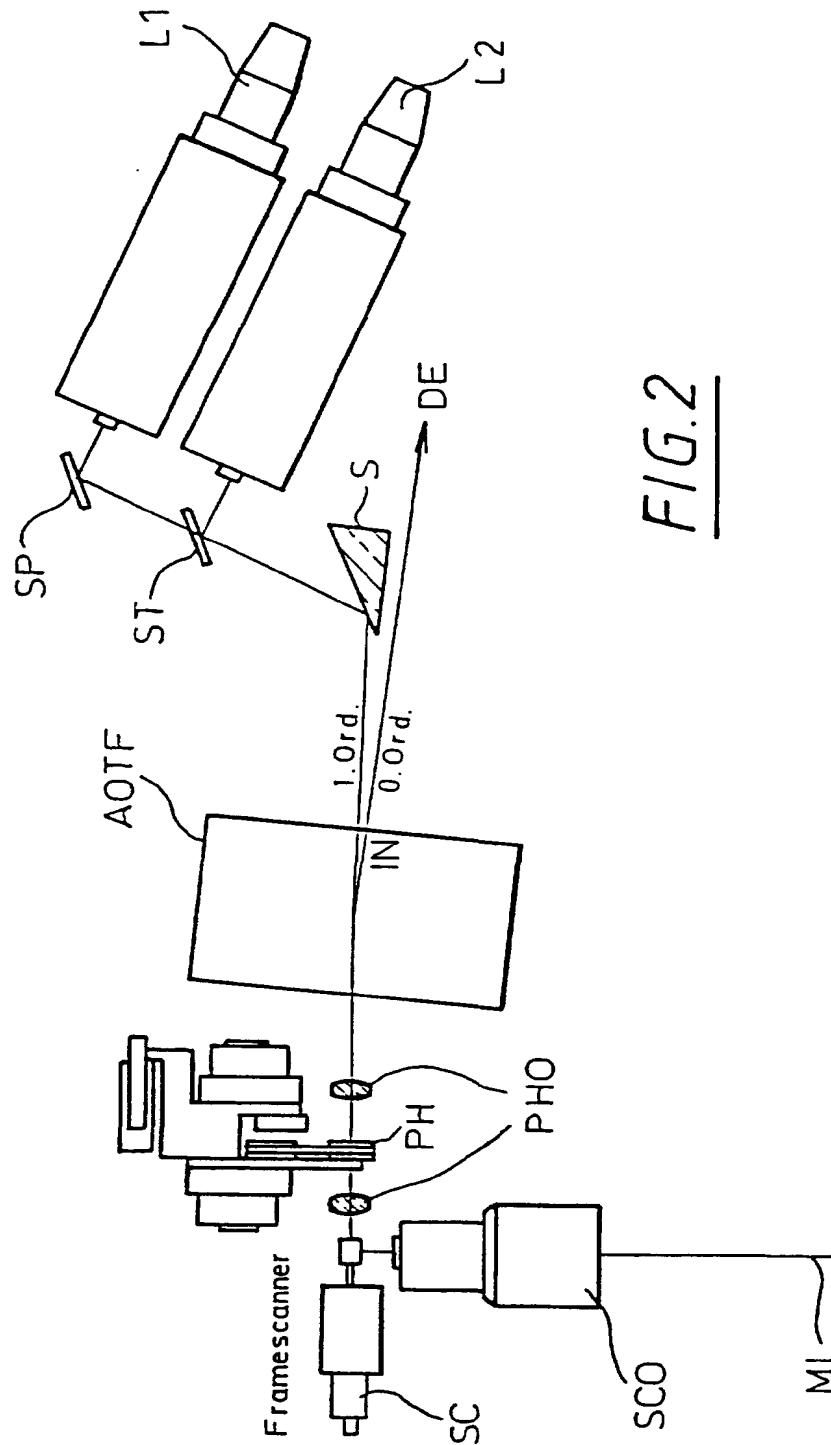


FIG. 2